茉莉酸甲酯处理对棉铃虫生长和解毒能力的影响

范银君, 康志娇, 王志超, 史雪岩*, 高希武

(中国农业大学农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要:【目的】为明确茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)的不同处理方式对昆虫生长和解毒代谢能力的影响,以及 MeJA 熏蒸处理昆虫对植物防御和昆虫解毒代谢之间关系的影响。【方法】本文比较了取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸等两种处理对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 3 龄末幼虫生长和解毒代谢酶活性的影响,并系统研究了经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫 3 龄末幼虫,再取食经 MeJA 喷雾处理的棉叶,其中肠解毒酶活性的变化。【结果】取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸两种不同处理,对棉铃虫幼虫的生长及解毒能力的影响有所不同。取食含 2.9 μg/g MeJA 的人工饲料显著抑制了棉铃虫的生长,同时诱导棉铃虫幼虫 P450 活性增加了 1.92 倍,而 MeJA 熏蒸虽然没有影响棉铃虫幼虫的生长,但 MeJA 熏蒸处理使棉铃虫幼虫 P450 活性和羧酸酯酶活性分别增加了 2.94 倍和 1.16 倍。经 MeJA 熏蒸处理后的棉铃虫幼虫,再取食正常的或经 MeJA 喷雾处理的棉叶,其幼虫 P450 活性显著增加,其中经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫,再取食经 MeJA 喷雾处理的棉叶,其 P450 酶显示了最高活性。【结论】MeJA 熏蒸处理棉铃虫,不仅使棉铃虫中与 P450 酶相关的解毒能力显著增加,而且增加了棉铃虫对于 MeJA 所诱导的棉花防御反应的解毒能力。

关键词: 棉铃虫; 棉花; 植物防御; 茉莉酸甲酯; 生长; P450 酶; 解毒酶

中图分类号: Q968　**文献标识码:** A　**文章编号:** 0454-6296(2014)03-0315-08

Effects of methyl jasmonate treatment on the growth and detoxifying abilities of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

FAN Yin-Jun, KANG Zhi-Jiao, WANG Zhi-Chao, SHI Xue-Yan*, GAO Xi-Wu (College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】To clarify the effects of methyl jasmonate (MeJA) treatments on the growth and detoxifying metabolic abilities of insects, and the effects of MeJA fumigation on the relationship between plant defense and insect detoxifying metabolism. 【Methods】The influences of feeding MeJA and MeJA fumigation on the growth and the activities of detoxifying enzymes in the late 3rd instar larvae of *H. armigera* were examined, and the changes of detoxifying enzymes in *H. armigera* larvae, which fed the MeJA-sprayed cotton leaves after fumigation with MeJA, were also studied. 【Results】Feeding MeJA and MeJA fumigation produced different effects on the growth and the detoxifying abilities of *H. armigera* larvae. Feeding the artificial diet containing 2.9 μg/g MeJA inhibited the growth of *H. armigera* larvae, and induced 1.92-fold increase in P450 activities. However, after fumigation with MeJA, no significant effects on the growth of *H. armigera* larvae were observed, while the activities of P450 and carboxylesterases (CarEs) increased to 2.94 and 1.16 times as high as the control, respectively. The P450 activities in *H. armigera* larvae, which experienced MeJA fumigation firstly and then fed the normal or MeJA-sprayed cotton leaves, were significantly induced, and *H. armigera* larvae, which fed the MeJA-sprayed cotton leaves after fumigation with MeJA, exhibited the highest P450 activity. 【Conclusion】MeJA fumigation induces the P450 related detoxifying abilities, and increases the detoxifying abilities in *H. armigera* against cotton defense responses induced by MeJA.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cotton; plant defense; MeJA; growth; P450 enzymes; detoxifying enzyme

茉莉酸(jasmonic acid, JA)/茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)是植物中与植物损伤相关

基金项目: 农业部公益性行业科技专项(200903033); 国家自然科学基金项目(30771426); 教育部"新世纪优秀人才支持计划"项目(NCET-06-0113)

作者简介: 范银君, 女, 1989 年生, 四川广元人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理, E-mail: fanyinjun89@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shixueyan@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-12-04; 接受日期 Accepted: 2014-02-23

的植物激素和信号分子,广泛存在于各种植物体内(Kessler and Baldwin, 2002),在植物抗虫抗损伤等防御功能中发挥着重要作用。当植物受到植食性昆虫取食或机械损伤时,植物中的亚麻酸会从植物细胞膜释放,进入硬脂酸途径,在经过一系列的酶催化反应后,转化生成具有活性的 JA/MeJA,刺激植物中防御基因的表达,从而诱导植物产生防御响应,达到防御的目的(Schaller *et al*., 2004)。

JA/MeJA 诱导的植物防御主要包括直接防御和间接防御。其中,直接防御主要是指经诱导后植物产生有毒化合物直接用于防御,如植物中的多酚氧化酶(Jaiti *et al*., 2009)、棉酚(Zhang *et al*., 2011)、蛋白酶抑制剂(Glawe *et al*., 2003)和过氧化物酶(Jaiti *et al*., 2009)等可以阻碍昆虫取食和抑制昆虫消化(Chen *et al*., 2005; Balbi and Devoto, 2008);间接防御主要是指植物被诱导后产生大量挥发性的化合物,这些挥发物不仅能在植物体内、植物之间、昆虫和植物之间起着防御信号的传递作用,同时还能驱避植食性昆虫和吸引天敌,从而使植物对昆虫取食产生间接的防御作用(De Moraes *et al*., 2001)。研究发现,对植物外源应用 JA/MeJA,也能够刺激植物内源 JA 的产生,从而激发植物防御基因的表达,诱导植物的化学防御,而且对植物外源应用 JA/MeJA,所诱导的植物防御响应与昆虫取食和机械损伤对植物防御的诱导作用相似(Thaler *et al*., 1996; Heitz *et al*., 1997; Pluskota *et al*., 2007)。

昆虫与植物在自然界经过数亿年的协同进化,不仅植物对植食性昆虫的取食产生了多种防御机制,同时植食性昆虫也发展了多种策略以减弱和应对植物的化学防御机制(Musser *et al*., 2002; Despres *et al*., 2007; Thaler *et al*., 2012)。如为了避免受到植物毒素物质的毒害,昆虫具有寄主和取食行为的选择(Chapman, 2003; Despland and Simpson, 2005)、操纵调控植物化学防御响应的能力(Musser *et al*., 2002; Helmus and Dussourd, 2005),以及对植物毒素物质的代谢能力等。其中昆虫对植物毒素物质的代谢是昆虫应对植物防御的最主要的手段之一(Glendinning, 2002)。

昆虫解毒酶的表达和代谢能力,可以被昆虫取食含有植物次生化合物或外源化合物的食物所诱导。昆虫对植物毒素的代谢抗性,还可能由于昆虫中编码代谢酶的基因发生了特定突变,从而导致昆虫对植物毒素的代谢能力有所增强所导致(Wen *et al*., 2005)。昆虫解毒代谢酶系主要包括细胞色素 P450 酶(P450s)、羧酸酯酶(carboxylesterases, CarEs)及谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)等。其中,由于植食性昆虫的 P450 基因多样性,使昆虫 P450s 具有广泛的底物以及催化功能的多样性,从而使昆虫的 P450s 与昆虫对大量外源物质的代谢抗性密切相关。因此,相对于羧酸酯酶,昆虫 P450 活性更容易被外来物质所诱导,而且昆虫 P450s 在昆虫对植物次生代谢物的代谢以及在植物-昆虫之间的相互作用中发挥着重要作用(Scott, 2008)。

作为植物防御信号物质的 JA/MeJA,其对植食性昆虫的解毒代谢能力的影响也引起了研究兴趣。Li 等(2002b)研究了 MeJA 处理对昆虫中与植物毒素物质代谢相关的解毒酶表达的影响,发现使用与棉花内源 MeJA 含量水平相当的 MeJA 处理玉米夜蛾 *Helicoverpa zea*,激活了玉米夜蛾体内与解毒植物化感物质相关的代谢酶 P450 基因的表达。但是,取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理对昆虫取食、生长以及解毒代谢酶活性的影响,以及 MeJA 熏蒸处理昆虫,对于昆虫解毒代谢与植物防御之间的相互关系的影响,还未见研究报道。

本工作在考察了取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 取食量和体重增长量影响的基础上,比较了取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理对棉铃虫中肠羧酸酯酶和 P450 活性影响的异同,研究了经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫,再取食经外源 MeJA 诱导处理的寄主植物棉花叶片,所导致的棉铃虫 P450 活性变化。通过研究可以掌握不同处理方式的 MeJA 对昆虫解毒代谢酶活性的影响作用,明确 MeJA 熏蒸暴露在昆虫应对 MeJA 诱导的植物防御响应中的作用,对于掌握 JA/MeJA 在诱导植物防御,及其与 JA/MeJA 诱导的昆虫解毒代谢之间的相互作用,具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试昆虫由中国农业大学昆虫毒理实验室提供,饲养条件为温度 26 ~ 27℃,相对湿度 70% ~ 80%。取棉铃虫 3 龄末幼虫用于实验。

供试棉花为中棉 35,由中国农业大学昆虫毒理实验室提供,于中国农业大学科学园温室种植,待长至 4 片真叶期用于实验。

1.2 化学试剂和仪器

95%茉莉酸甲酯（methyl jasmonate，MeJA）、固蓝 B 盐（fast blue B salt）、十二烷基硫酸钠（SDS）、毒扁豆碱（serine）、99.0% 苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl，PMSF）、98.0% 苯基硫脲（phenylthiourea，PTU）和 98.0% NADPH-Na_4 均为美国 Sigma 公司产品；二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）为美国 Promega 公司产品；99.0% 7-乙氧基香豆素（7-ethoxycoumarin，7-EC）、98.0% 7-羟基香豆素（7-hydroxycoumarin）为 Alfa Aesar 公司产品；牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）和乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）为北京同正生物公司产品；α-乙酸萘酯（α-naphthyl acetate，α-NA）和甘油（glycerol）等其他化学试剂为北京化学试剂公司产品。

紫外分光光度计（日本岛津 UV 2550 型，Shimadzu 公司）；Perkin Elmer LS 55 荧光分光光度计（Perkin Elmer，USA）；电子天平（Sartorius 2004M）（Opton，Germany）。

1.3 棉铃虫取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理

1.3.1 棉铃虫取食含有 MeJA 的人工饲料：将大小基本一致的 3 龄末幼虫（体重约 0.052 g/头）饥饿 4 h 后，分别单头移至含有 2.5 g 人工饲料的试管中，使棉铃虫取食 48 h。其中，饲料中 MeJA 的含量是 2.9 μg MeJA/g 饲料，通过将 MeJA 的标准品用乙醇稀释成相应的浓度后，加入饲料中混合而获得。此 MeJA 剂量与昆虫取食植物后，植物体内的 MeJA 含量相当（Li *et al.*，2002b）。将对照组棉铃虫幼虫分别单头移至含有等剂量无水乙醇的人工饲料的试管中。

1.3.2 MeJA 熏蒸处理棉铃虫：将棉铃虫幼虫移至含有常规饲料的试管中，同时在试管顶端悬挂滤纸，其上滴加与上述取食 MeJA 处理组试管中同样剂量的 MeJA 乙醇溶液，约 7.25 μg MeJA/管。对照组棉铃虫取食常规饲料，同时试管顶端悬挂的滤纸上滴加有无水乙醇。将各个处理试管分别用保鲜膜密闭，使棉铃虫取食饲料 48 h。其中，以上每个处理均处理棉铃虫 45 头，重复 3 次。

1.4 棉铃虫体重和取食量的测定

使棉铃虫饥饿 4 h 后，分别称取单头棉铃虫体重和饲料重量。将饥饿 4 h 的棉铃虫接到各处理组试管中，使棉铃虫取食相应饲料 48 h 后，再次对饲料和棉铃虫称重，以考察棉铃虫的取食量和体重增加量。同时，设置 10 个重复的空白饲料对照，其中不放入棉铃虫，用以校正由于自然风干失水而造成的饲料重量的损失量。

1.5 棉铃虫中肠解毒酶活性的测定

将处理后的棉铃虫幼虫在冰盘上解剖，取其中肠，将中肠的内容物除去，于 1.15% KCl 溶液中漂洗，用吸水纸吸干后，立即放入 −80℃冰箱备用。棉铃虫中肠粗酶液的制备参照 Ai 等（2010）法进行。

1.5.1 棉铃虫中肠羧酸酯酶的测定：将 5 头棉铃虫幼虫的中肠加入 1 mL 的磷酸盐缓冲液（0.04 mol/L，pH 7.0），匀浆，4℃ 10 000 g 下离心 20 min，上清液用脱脂棉过滤，收集滤液，分别用于羧酸酯酶活性和蛋白质含量测定的测定。在酶制备液中加入考马斯亮蓝 G-250 后，在 5 ~ 15 min 之内测定粗酶液中蛋白含量。以牛血清白蛋白（BSA）为标准品，测定并计算蛋白质浓度。

羧酸酯酶活性的测定参照 Ai 等（2010）的方法并加以改进。以 α-NA（母液浓度为 3×10^{-2} mol/L）为底物，使用时与毒扁豆碱（母液浓度为 3×10^{-2} mol/L）一起用 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液（PBS）稀释至 3×10^{-4} mol/L。取 50 μL 酶制备液加入到含 0.45 mL 0.04 mol/L pH 7.0 的 PBS 以及 3.6 mL 3×10^{-4} mol/L α-NA 的反应溶液中启动反应，在 30℃恒温水浴中，振摇反应 15 min 后，加入 0.9 mL 显色剂（1% 固蓝 B 盐 + 5% SDS）终止反应，于 600 nm下测定光吸收值。

用不同浓度的 α-萘酚标准品取代底物，按照酶活测定的步骤制作标准曲线，以 nmol（α-萘酚）/mg pro · min 表示羧酸酯酶对 α-NA 的水解活性。

1.5.2 棉铃虫中肠 P450 活性测定：将 10 头幼虫的中肠加入 2.0 mL 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液（含 1 mmol/L EDTA，1 mmol/L PMSF，1 mmol/L DTT 和 15% 甘油），匀浆，在 4℃ 10 000g 下离心 15 min，上清液用脱脂棉过滤，用于进行酶活性和蛋白质含量测定。

在酶制备液中加入考马斯亮蓝 G-250 后，在5 ~ 15 min 之内测定酶液中蛋白含量。以牛血清白蛋白 BSA 为标准品计算蛋白质浓度。

P450 单加氧酶活性的测定，参考 Ai 等（2010）并加以改进。称取适量 7-乙氧基香豆素并用乙醇溶解，用 0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液将底物稀释至合适的浓度。反应体系为：反应缓冲液含 650 μL pH 7.0 Tris-HCl，25 μL 底物 7-乙氧基香豆素，10 μL NADPH，在反应体系中加入 250 μL 酶液启动反应，在 30℃恒温水浴中摇振反应 15 min 后，

加入 300 μL TCA 终止反应。反应液充分混合后，转入 1 mL 离心管中，于 4℃ 7 000 g 下离心 3 min，将上清液转入玻璃管中，加入 0.7 mL 1.6 mol /L Gly-NaOH(pH 10.4)，充分混合，在激发波长为 380 nm，发射波长为 450 nm 下，测定产物的荧光值。

用不同浓度的 7-羟基香豆素标准品取代底物，按照酶活测定的步骤制作标准曲线，以 pmol（7-羟基香豆素）/mg protein · min 表示细胞色素 P450 对 7-乙氧基香豆素的 O-脱乙基酶活性。

1.5.3 MeJA 熏蒸处理棉铃虫：参考 1.3.2 节方法进行。使棉铃虫 3 龄末幼虫暴露于滴加有 MeJA 的滤纸下，取食常规饲料 48 h。对照棉铃虫仅经乙醇熏蒸处理，取食常规饲料。

1.5.4 MeJA 喷雾处理棉花植株：用含 0.1% Triton X-100 的蒸馏水配制 1 mmol/L MeJA 溶液，用于喷施棉叶正反面，直至液体流，其中每片叶子上接受的 MeJA 约为 3 μmol。将对照组棉花植株用含 0.1% Triton X-100 的蒸馏水，喷施棉叶正反面，直至液体流。将喷施处理的棉株放入密闭罩内生长 24 h 后，再放入正常通风的条件下继续生长。

1.5.5 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食经 MeJA 喷雾处理的棉花叶片：将经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫，接到经 MeJA 喷雾处理后 7 d 的棉花植株的同一位置的叶片(第 3 片真叶)上，并进行套袋以固定棉铃虫的取食范围。所设置的处理及对照如下：

处理 1：对照组棉铃虫取食对照组棉叶(对照虫 + 对照叶)；

处理 2：MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食对照组棉叶(处理虫 + 对照叶)；

处理 3：对照组棉铃虫取食 MeJA 处理组棉叶(对照虫 + 处理叶)；

处理 4：MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食 MeJA 处理的棉叶(处理虫 + 处理叶)。

针对以上各个处理组的棉铃虫，在棉铃虫取食棉叶 24 h 时，收集棉铃虫，并解剖获得中肠，测定棉铃虫中肠 P450 活性，参考 1.5.2 方法测定。

1.6 数据统计与方法

利用统计分析软件 GraphPad Instat 3.00 对实验所得数据进行统计分析，对于两组数据的差异显著性，采用 *t*-检验进行分析；对于两组以上数据的差异显著性，采用 ANOVA 分析中的 Duncan 氏检验进行分析。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果与分析

2.1 取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理对棉铃虫取食量和体重增加量的影响

分别使棉铃虫 3 龄末幼虫取食含有 2.9 μg /g MeJA 的人工饲料，以及使棉铃虫暴露于 MeJA 熏蒸下取食常规饲料，于 48 h 后，考察棉铃虫对饲料的取食量和棉铃虫的体重变化，结果如图 1 和图 2 所示。

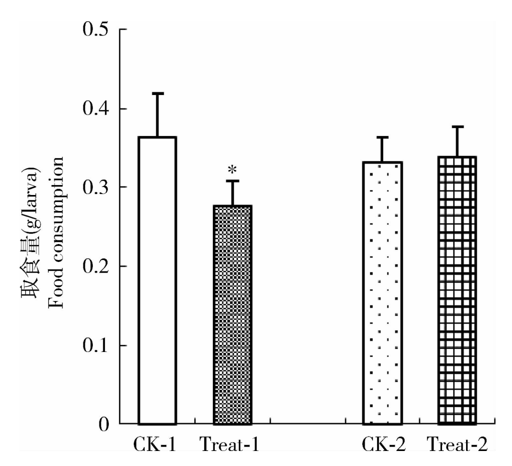


图 1 取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理 48 h 的棉铃虫 3 龄末幼虫取食量

Fig. 1 Food consumption of the late 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* feeding the artificial diet containing MeJA or under MeJA fumigation for 48 h

CK-1：取食正常饲料 48 h 的棉铃虫 *H. armigera* feeding the normal artificial diet for 48 h；Treat-1：取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料 48 h 的棉铃虫 *H. armigera* feeding the artificial diet containing 2.9 μg/g MeJA for 48 h；CK-2：未经 MeJA 熏蒸，取食正常饲料 48 h 的棉铃虫 *H. armigera* feeding the normal artificial diet for 48 h, without MeJA fumigation；Treat-2：暴露于 MeJA 熏蒸下，取食正常饲料 48 h 的棉铃虫 *H. armigera* feeding the normal artificial diet for 48 h, under MeJA fumigation. 图中数值为平均值 ± 标准误；柱上星号表示 *t*-检验差异显著($P < 0.05$，成对 *t* 检验)。图 2 ~ 4 同。Data in the figure are mean ±*SE*; asterisks above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, using paired *t*-test). The same for Figs. 2 – 4.

由图 1 可知，大小一致的棉铃虫 3 龄末幼虫，取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料 48 h，其取食量显著小于棉铃虫对正常饲料的取食量。而暴露于 MeJA 熏蒸下的棉铃虫，使其取食常规饲料 48 h，其取食量与未经 MeJA 熏蒸的棉铃虫的取食量没有显著差异。说明不同的 MeJA 处理方法对棉铃虫的取食量具有不同的影响，其中饲料中含有 2.9 μg/g MeJA 显著抑制了棉铃虫的取食量，对棉铃虫幼虫产生了

一定的拒食影响作用，而 MeJA 熏蒸处理棉铃虫，没有对棉铃虫的取食量产生显著影响。

由图 2 可知，大小一致的棉铃虫 3 龄末幼虫，取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料 48 h 后，其体重的增加量显著小于取食正常饲料棉铃虫的体重增加量。而暴露于 MeJA 熏蒸下，取食常规饲料的棉铃虫，48 h 后，其体重增加量与未经熏蒸的对照组棉铃虫的体重增加量没有显著差异。说明两种不同的 MeJA 处理方法对棉铃虫的体重增加具有不同的影响。其中饲料中含有 2.9 μg/g MeJA，导致了棉铃虫体重增长的显著减少，对棉铃虫幼虫的生长发育产生了一定的负面影响作用，而 MeJA 熏蒸处理棉铃虫，没有显著影响棉铃虫幼虫的体重增加。

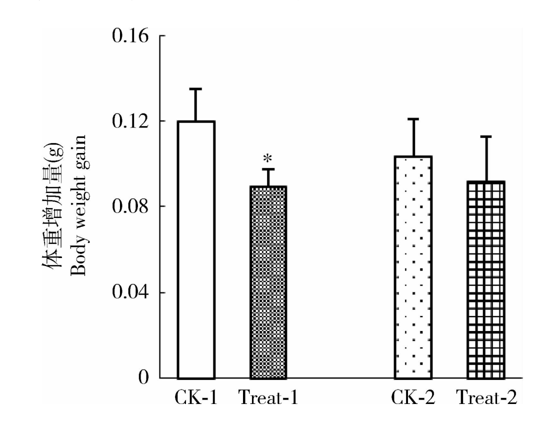


图 2　取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理 48 h 的棉铃虫 3 龄末幼虫体重增加量

Fig. 2　Body weight gain of the late 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* feeding the artificial diet containing MeJA or under MeJA fumigation for 48 h

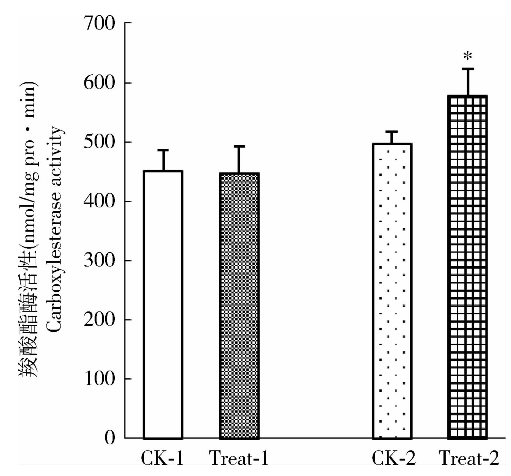


图 3　取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理 48 h 的棉铃虫 3 龄末幼虫中肠羧酸酯酶活性

Fig. 3　Carboxylesterase activity in the late 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* feeding the artificial diet containing MeJA or under MeJA fumigation for 48 h

2.2　取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理对棉铃虫中肠羧酸酯酶和 P450 活性的影响

使棉铃虫 3 龄幼虫取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料，以及使棉铃虫暴露于 MeJA 下，取食常规饲料，于 48 h 后，分别考察棉铃虫中肠羧酸酯酶和 P450 活性，结果如图 3 和图 4 所示。

由图 3 可知，与取食常规饲料的棉铃虫相比，棉铃虫 3 龄末幼虫取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料 48 h，对棉铃虫中肠羧酸酯酶的活性没有产生显著影响。而暴露于 MeJA 熏蒸处理下，取食常规饲料 48 h 的棉铃虫，其中肠羧酸酯酶的活性比其对照有了显著增高。并且，暴露于 MeJA 熏蒸处理下取食常规饲料的棉铃虫，其中肠羧酸酯酶的水解活性也显著高于取食含有 2.9 μg/g MeJA 饲料的棉铃虫中肠羧酸酯酶的活性。

由图 4 可知，棉铃虫 3 龄末幼虫在取食含有

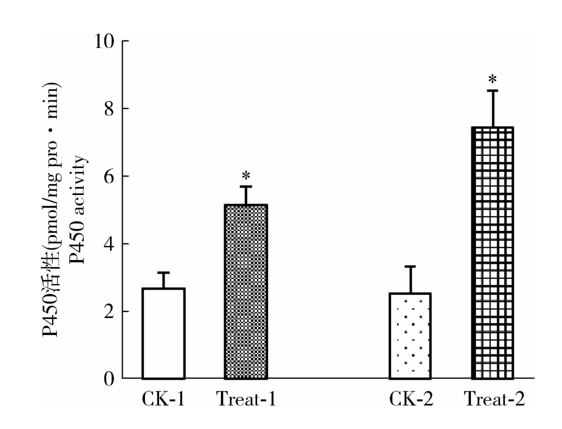


图 4　取食 MeJA 与 MeJA 熏蒸处理 48 h 的棉铃虫 3 龄末幼虫中肠 P450 活性

Fig. 4　P450 activity in the late 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* feeding the artificial diet containing MeJA or under MeJA fumigation for 48 h

2.9 μg/g MeJA 饲料 48 h 后，其中肠 P450 O-脱乙基活性比对照增加了 1.92 倍；而暴露于 MeJA 熏蒸下，取食常规饲料的棉铃虫，其中肠 P450 O-脱乙基活性比相应对照增加了 2.94 倍。并且，暴露于 MeJA 熏蒸下取食常规饲料的棉铃虫，其中肠 P450 O-脱乙基活性显著高于取食含有 2.9 μg/g MeJA 饲料的棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性。

可见，两种不同的 MeJA 处理方式，对棉铃虫中肠的羧酸酯酶活性的影响不同，其中 MeJA 熏蒸处理显著诱导了棉铃虫中肠羧酸酯酶对 α-NA 的水解活性增加，而取食含有 2.9 μg/g MeJA 的饲料，没有显著影响棉铃虫中肠羧酸酯酶的水解活性。而两种

不同的 MeJA 处理方式均能显著诱导棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性，其中 MeJA 熏蒸处理对棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性的诱导能力比取食 MeJA 更强。

2.3 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食 MeJA 喷雾处理的棉叶对其中肠 P450 活性的影响

在暴露于 MeJA 熏蒸下，使棉铃虫 3 龄末幼虫取食常规饲料 48 h，再将棉铃虫转移至经 1 mmol/L MeJA 喷雾处理后 7 d 的棉花叶片上取食 24 h，考察棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性，结果见图 5。

图 5 中，比较 Treat-1 和 Treat-2 的结果可知，与未经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫相比，MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食常规棉花叶片 24 h，其中肠 P450 O-脱乙基活性显著增加。比较 Treat-3 与 Treat-4 的结果可知，与未经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫相比，MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食经 1 mmol/L MeJA 喷雾处理后 7 d 的棉花叶片 24 h，其中肠 P450 O-脱乙基活性也显著增加。其中，MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食经 MeJA 处理的棉叶，其中肠 P450 O-脱乙基活性显著超过了 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食正常棉叶后的 P450 O-脱乙基活性。可见，MeJA 熏蒸处理棉铃虫，显著影响了棉铃虫对取食正常棉叶以及对取食 MeJA 处理的棉叶所产生的响应。

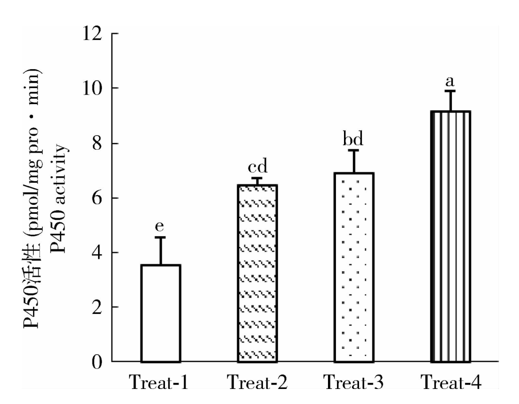


图 5 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫 3 龄末幼虫取食 MeJA 处理的棉叶 24 h 后中肠 P450 活性的变化

Fig. 5 Changes in P450 activity in the late 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* pretreated by MeJA fumigation and then feeding the MeJA-sprayed cotton leaves for 24 h

Treat-1：取食正常棉叶 24 h 且未经 MeJA 熏蒸的对照组 The control group not be pretreated by MeJA fumigation and feeding the normal cotton leaves for 24 h; Treat-2：取食正常棉叶 24 h 的 MeJA 熏蒸处理组 The treatment group feeding the normal cotton leaves for 24 h after being pretreated by MeJA fumigation; Treat-3：取食 MeJA 处理棉叶 24 h 的未经 MeJA 熏蒸的处理组 The treatment group not be pretreated by MeJA fumigation and feeding the MeJA-sprayed cotton leaves for 24 h; Treat-4：取食 MeJA 处理棉叶 24 h 的 MeJA 熏蒸处理组 The treatment group feeding the MeJA-sprayed cotton leaves after being pretreated by MeJA fumigation. 图中数值为平均值 ± 标准误；柱上不同字母示不同处理组 P450 活性间差异显著（$P < 0.05$, Duncan 氏多重比较）。Data in the figure are mean ±*SE*; different letters above bars indicate significant difference in P450 activities among different treatments ($P < 0.05$, using Duncan's multiple range test).

图 5 中，比较 Treat-1 和 Treat-3 的结果可知，与取食常规棉叶相比，棉铃虫取食 MeJA 处理的棉花叶片 24 h，其中肠 P450 O-脱乙基活性显著增加。并且，比较 Treat-2 与 Treat-4 的结果可知，与取食未经 MeJA 处理的棉叶相比，经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫，再取食经 1 mmol/L MeJA 处理后 7 d 的棉花叶片 24 h，其中肠 P450 O-脱乙基活性也显著增加，显著超过了 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食正常叶片，以及未经处理的棉铃虫取食 MeJA 处理的棉叶后的棉铃虫 P450 O-脱乙基活性。可见，取食 MeJA 处理的棉花叶片，对棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性也可产生一定的诱导作用，经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食 1 mmol/L MeJA 处理后 7 d 的棉叶 24 h，其中肠 P450 O-脱乙基活性最大。

3 讨论

从图 1 和图 2 的结果可以看出，取食含 MeJA 的饲料 48 h 后，棉铃虫 3 龄末幼虫的取食量和体重增量均显著降低，而经 MeJA 熏蒸处理 48 h 后，棉铃虫的取食量和体重增量均无显著变化。这应与经取食摄入的 MeJA 可能会对棉铃虫的消化系统产生一定的影响，从而使棉铃虫幼虫对含有 MeJA 的饲料产生了拒食行为有关。饲料中 MeJA 的拒食作用，导致棉铃虫对含有 MeJA 的人工饲料的取食量有所降低，进而影响了棉铃虫的正常生长及体重增加。与取食摄入 MeJA 相比，MeJA 熏蒸处理棉铃虫没有对其取食及生长产生影响，这可能是由于通过呼吸系统摄入的 MeJA 量较少，而且 MeJA 气体对棉铃虫取食行为的影响作用不明显，因而未能对棉铃虫的饲料取食量和棉铃虫的体重增加产生影响。

当受到外来毒性物质的胁迫时，植食性昆虫通常会通过增加其解毒酶的活性，从而对外来毒性物质产生解毒代谢作用。羧酸酯酶和细胞色素 P450s 均是植食性昆虫的重要解毒酶，其活性可以被植物次生物质诱导（Wen *et al*., 2005; Scott, 2008）。Li 等（2002b）研究发现，玉米夜蛾 5 龄幼虫取食含有 2.9 μg/g MeJA 的人工饲料 48 h，其中肠 P450 基因 *CYP6B8*，*CYP6B9*，*CYP6B27* 和 *CYP6B28* 的表达均

被显著诱导了。本研究结果表明(图 3 和图 4)，取食含 MeJA 的人工饲料导致了棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性的显著增加。MeJA 熏蒸处理也显著诱导了棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性的增加，而且与棉铃虫取食 MeJA 相比，MeJA 熏蒸处理棉铃虫对棉铃虫 P450 O-脱乙基活性的诱导作用更强。这表明，MeJA 作为植物防御信号物质，其不仅会对植物的防御产生一定的诱导作用，取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理也对棉铃虫的 P450 活性及相关的解毒代谢能力产生了诱导作用，使得棉铃虫可以更好地对植物防御物质进行解毒代谢。

虽然取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸均显著诱导了棉铃虫的 P450 活性，与取食 MeJA 相比，棉铃虫暴露于 MeJA 熏蒸处理，更有效地诱导了棉铃虫的 P450 活性增加，这应与 MeJA 作为挥发性的信号物质，气态 MeJA 的传导效率更高、信号作用更强和更有效有关。当棉铃虫需要捕捉植物的防御信号 MeJA 并产生响应时，棉铃虫对 MeJA 通过嗅觉感知而产生响应，应比通过取食摄入而感知并产生响应，具有更高的防御响应效率和更大的实际防御价值。类似地，取食 MeJA 没有显著诱导棉铃虫中肠羧酸酯酶活性，而 MeJA 熏蒸处理显著地诱导了棉铃虫中肠羧酸酯酶活性的增加。因此，与通过取食摄入及消化系统对棉铃虫产生影响相比，MeJA 通过呼吸系统可以更为有效及显著地影响棉铃虫中肠羧酸酯酶和 P450 活性。

本研究中用于棉铃虫取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸处理的 MeJA 剂量，与植物受伤后所产生的内源 MeJA 含量水平相当。本研究发现，对棉铃虫分别进行取食 MeJA 和 MeJA 熏蒸两种处理，MeJA 均显著影响了棉铃虫中肠的两种解毒酶——羧酸酯酶和 P450 活性，这表明棉铃虫在取食受伤害的棉花植株时，棉株受伤后所产生的 MeJA，不仅能诱导棉花产生防御物质，这些 MeJA 还可以通过取食摄入以及挥发熏蒸等两种方式，显著诱导棉铃虫的解毒酶活性，从而增加了棉铃虫对植物防御物质的解毒代谢能力。

对植物外源应用 MeJA 可以提高植物的防御能力，如诱导了棉株等植物中蛋白酶抑制剂(Chen *et al.*, 2005; Balbi and Devoto, 2008)，以及棉酚等次生代谢物的产生(Zhang *et al.*, 2011)。当昆虫取食含有次生代谢物的植物时，昆虫解毒酶活性也会有所升高，从而提高了昆虫对植物次生物质的解毒代谢能力(Li *et al.*, 2002a; Karban *et al.*, 2011)。未经 MeJA 熏蒸处理的棉铃虫，取食经外源 1 mmol/L MeJA 喷雾处理 7 d 的棉花叶片 24 h 时，其中肠 P450 活性显著大于其取食未经 MeJA 处理的棉花叶片的活性；经 MeJA 熏蒸处理 48 h 的棉铃虫幼虫，再取食经外源 1 mmol/L MeJA 喷雾处理 7 d 的棉花叶片 24 h 时，其中肠 P450 活性不仅显著大于其取食未经 MeJA 处理的正常棉叶后的活性，而且显著大于未经处理的棉铃虫取食经 MeJA 处理的棉叶后的棉铃虫 P450 O-脱乙基活性(图 5)。这表明棉铃虫经 MeJA 熏蒸处理后，棉铃虫提高了其对外源 MeJA 诱导的寄主植物棉花叶片防御的解毒能力。

MeJA 熏蒸处理棉铃虫后，显著诱导了棉铃虫 P450 活性对棉叶防御的响应。这应与 MeJA 熏蒸处理后棉铃虫中 P450 活性有所增加，使棉铃虫取食植物叶片时，棉铃虫对植物次生物质的防御响应和代谢能力更为强烈有关。取食经 MeJA 处理的棉花叶片，对棉铃虫中肠 P450 O-脱乙基活性也产生了强烈的诱导作用，这应与 MeJA 处理棉叶后诱导了棉叶中次生物质的产生，从而对取食棉叶的棉铃虫 P450 活性造成了影响有关。因此，MeJA 熏蒸处理的棉铃虫取食 MeJA 处理的棉叶，其中肠 P450 O-脱乙基活性显著超过了 MeJA 熏蒸处理后的棉铃虫取食正常棉叶，以及未经处理的棉铃虫取食 MeJA 处理的棉叶后的 P450 O-脱乙基活性。

因此，MeJA 在植物与昆虫的防御体系中具有双重作用，一方面诱导了植物对昆虫取食的防御，另一方面使昆虫对于植物的防御反应具有了一定的解毒代谢能力。MeJA 在植物的抗虫防御以及相关的昆虫对植物次生物质的解毒代谢中，具有一定的调节作用。但要完全明确 MeJA 在植物防御和昆虫的解毒代谢中的诱导作用，掌握植物防御与昆虫解毒代谢之间的关系，还应在昆虫取食强度与植物防御的关系中，以及在植物防御与昆虫的解毒代谢之间的调节与平衡作用中，详细研究 MeJA 在植物防御与昆虫解毒代谢之间的动态调节作用，即关于 MeJA 在昆虫的取食强度与植物防御、植物防御与昆虫的解毒代谢之间的调节作用的强度与时间效应，还有待于进一步深入研究。

参考文献 (References)

Ai GM, Zou DY, Shi XY, Li FG, Liang P, Song DL, Gao XW, 2010. HPLC assay for characterizing α-cyano-3-phenoxybenzyl pyrethroids hydrolytic metabolism by *Helicoverpa armigera* (Hübner) based on the quantitative analysis of 3-phenoxybenzoic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 694 – 701.

Balbi V, Devoto A, 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.*, 177: 301-318.

Chapman RF, 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 455-484.

Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA, 2005. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 19237-19242.

De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH, 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410: 577-580.

Despland E, Simpson SJ, 2005. Food choices of solitarious and gregarious locusts reflect cryptic and aposematic antipredator strategies. *Anim. Behav.*, 69: 471-479.

Després L, David JP, Gallet C, 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evol.*, 22(6): 298-307.

Glendinning JI, 2002. How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomol. Exp. Appl.*, 104: 15-25.

Glawe GA, Zavala JA, Kessler A, Van Dam NM, Baldwin IT, 2003. Ecological costs and benefits correlated with trypsin protease inhibitor production in *Nicotiana attenuata*. *Ecology*, 84: 79-90.

Heitz T, Bergey DR, Ryan CA, 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 114(3): 1085-1093.

Helmus MR, Dussourd DE, 2005. Glues or poisons: which triggers vein cutting by monarch caterpillars? *Chemoecology*, 15: 45-49.

Jaiti F, Verdeil JL, IE Hadrami I, 2009. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 74: 84-90.

Karban R, 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Funct. Ecol.*, 25: 339-347.

Kessler A, Baldwin IT, 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 299-328.

Li XC, Berenbaum MR, Schuler MA, 2002b. Plant allelochemicals differentially regulate *Helicoverpa zea* cytochrome P450 genes. *Insect Mol. Biol.*, 11(4): 343-351.

Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR, 2002a. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419(6908): 712-715.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW, 2002. Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences - a new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. *Nature*, 416: 599-600.

Pluskota WE, Qu N, Maitrejean M, Boland W, Baldwin IT, 2007. Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence responses in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.*, 58: 4071-4082.

Schaller F, Schaller A, Stintzi A, 2004. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.*, 23: 179-199.

Scott JG, 2008. Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification. Recent advances in insect physiology. *Toxicol. Mol. Biol.*, 117-124.

Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK, 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.*, 17(5): 260-270.

Thaler JS, Stout MJ, Karban R, Duffey SS, 1996. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. *J. Chem. Ecol.*, 22: 1767-1781.

Wen ZM, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA, 2005. Ile115Leu mutation in the SRS1 region of an insect cytochrome P450 (CYP6B1) compromises substrate turnover via changes in a predicted product release channel. *Protein Eng. Des. Sel.*, 18: 191-199.

Zhang PJ, Zhu XY, Huang F, Liu Y, Zhang JM, Lu YB, Ruan YM, 2011. Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the mealybug *Phenacoccus solenopsis*. *PLoS ONE*, 6(7): 1-9.

（责任编辑：赵利辉）